应用差示扫描量热法检测昆虫总蛋白的热滞活性

崔宁宁[1,2]，宋希明[3]，邹元平[4]，郝树广[2]，
许永玉[1,*]，王宪辉[2,*]

（1. 山东农业大学植物保护学院，山东泰安 271018；2. 中国科学院动物研究所，农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100101；3. 内蒙古大兴安岭林业科学技术研究所，内蒙古牙克石 022150；4. 内蒙古大兴安岭林业管理局森防站，内蒙古牙克石 022150）

摘要：产生抗冻蛋白是寒带昆虫抵御低温的重要机制之一，但检测其活性仍存在一些困难，尤其对于个体较小的昆虫样品。为了探索差示扫描量热法是否适于检测昆虫总蛋白的热滞活性，本研究利用差示扫描量热法对黄粉虫 *Tenebrio molitor* 幼虫的总蛋白和血淋巴分别进行了热滞活性检测。结果表明：黄粉虫总蛋白的热滞活性(0.49 ~ 0.98℃)要低于血淋巴(2.54 ~4.34℃)。通过这种方法，进一步检测了3种在内蒙古大兴安岭林区采集到的越冬昆虫：稠李巢蛾 *Yponomeuta evonymallus* 幼虫、舞毒蛾 *Lymantria dispar* 卵和落叶松八齿小蠹 *Ips subelongatus* 成虫。结果发现，它们都存在热滞活性，其中稠李巢蛾的热滞活性为 0.34 ~0.43℃，舞毒蛾的热滞活性为 0.35 ~ 0.42℃，落叶松八齿小蠹的热滞活性为 0.37 ~0.40℃，说明这3种昆虫能以产生抗冻蛋白的方式作为越冬策略之一。本研究表明通过差示扫描量热法检测昆虫总蛋白是否存在热滞活性来判断抗冻蛋白的存在是可行的。

关键词：黄粉虫；总蛋白；抗冻蛋白；热滞活性；差示扫描量热法

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2013)02-0131-05

Detecting thermal hysteresis activity of the total protein in insects with differential scanning calorimetry

CUI Ning-Ning[1,2], SONG Xi-Ming[3], ZOU Yuan-Ping[4], HAO Shu-Guang[2], XU Yong-Yu[1,*], WANG Xian-Hui[2,*] (1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3. Daxing'anling Academy of Forestry Science of Inner Mongolia, Yakeshi, Inner Mongolia 022150, China; 4. Forest Disease and Pest Control Station, Daxing'anling Forestry Bureau of Inner Mongolia, Yakeshi, Inner Mongolia 022150, China)

Abstract: Producing antifreeze proteins is one of the most important mechanisms underlying insect cold tolerance. However, detecting the activity of antifreeze proteins still has some difficulties, especially when only a few of insect samples are available from fields. In order to explore if differential scanning calorimetry (DSC) can be used to detect thermal hysteresis activity (THA) of the total protein in insects, the THA of the total protein and hemolymph from *Tenebrio molitor* larvae was detected by DSC. The results showed that the THA of the total protein (0.49 – 0.98℃) is lower than that of hemolymph (2.54 – 4.34℃) in *T. molitor*. In addition, we collected three overwintering insect species (*Lymantria dispar* larvae, *Yponomeuta evonymallus* eggs and *Ips subelongatus* adults) in the Daxing'anling Forest Region in Inner Mongolia, and then prepared their total protein. Using DSC, the THA of the total protein from the three insect species were respectively analyzed. The results showed that each of them had thermal hysteresis activity, and the THA was 0.34 – 0.43℃ for *L. dispar*, 0.35 – 0.42℃ for *Y. evonymallus* and 0.37 – 0.40℃ for *I. subelongatus*, suggesting that the three insect species can improve their cold tolerance through producing antifreeze proteins. This study indicates that the differential scanning calorimetry is feasible to identify whether one insect species contains antifreeze proteins through detecting thermal hysteresis activity of the total protein.

基金项目：转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08009-099B)

作者简介：崔宁宁，男，1986 年生，山东济宁人，硕士研究生，研究方向为昆虫生理生态，E-mail：nanrenersi@163.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail：xuyy@sdau.edu.cn；wangxh@ioz.ac.cn

收稿日期 Received：2012-12-21；接受日期 Accepted：2013-01-15

Key words: *Tenebrio molitor*; total protein; antifreeze proteins; thermal hysteresis activity; differential scanning calorimetry

昆虫作为变温动物,其生长发育要经受冬季低温的制约。昆虫在长期的进化过程中,已经形成了一系列的适应对策和抗寒机制。例如,有的昆虫能够忍受体内结冰(Zhao and Kang, 2000),有的通过降低过冷却点和体内含水量的方法越冬(Kukal and Duman, 1989)。其中,抗冻蛋白(antifreeze proteins, AFPs)的产生是最为重要的低温适应策略之一。许多研究已经表明,不仅在昆虫的体液中,而且在昆虫的肠液和细胞内液中都有 AFPs 的产生(Kristiansen *et al*., 1999)。

抗冻蛋白是生物体产生的一类能提高其抗冻能力的多肽,它能够在较低的浓度下与冰晶结合并抑制冰晶的生长。AFPs 最重要的功能是能以非依数性的形式降低溶液的冰点而对其熔点影响甚微,从而导致熔点和冰点之间出现差值(Celik *et al*., 2010)。这个差值被称为热滞活性(thermal hysteresis activity, THA)。THA 是衡量抗冻蛋白活性最重要的指标,可以作为判断抗冻蛋白是否存在的标志。另外,抗冻蛋白还可以抑制重结晶过程并直接影响冰晶的形成过程(Knight and Duman, 1986)。

昆虫抗冻蛋白主要由脂肪体合成,经分泌、运输进入血淋巴行使功能。因此,血淋巴中含有相对丰富的抗冻蛋白。对昆虫抗冻蛋白的研究最初都是通过检测血淋巴是否存在热滞活性来判断抗冻蛋白的存在(Grimstone *et al*., 1968; Duman, 1976)。在对昆虫血淋巴热滞活性的检测中,早期使用较多的是显微镜观察法(Duman, 1976, 1980),目前比较常用的方法是纳升渗透压仪法(Graham *et al*., 1997)和差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)(Hansen and Baust, 1989)。差示扫描量热法由于能精确控制和测定体系的冰晶含量,测定结果精度和重复性高,且较为准确客观,近年来应用越来越多(张超等, 2008)。通过检测血淋巴是否存在热滞活性是判断昆虫抗冻蛋白存在的传统方法,对于难以收集血淋巴的微小昆虫和野外采集的珍稀样品不太适用。已经有报道利用其他方法,通过检测昆虫总蛋白的热滞活性,也可以鉴定抗冻蛋白的存在(Graham and Davies, 2005)。然而,能否通过 DSC 法来检测昆虫总蛋白是否存在热滞活性来判断 AFPs 的存在尚不清楚。

为了探究差示扫描量热法是否适于检测昆虫总蛋白的热滞活性,本研究提取了黄粉虫 *Tenebrio molitor* 幼虫的总蛋白,并用 DSC 法检测其 THA,并和血淋巴的检测结果进行比较,确定了方法的可行性。之后,用此法成功检测到野外采集的 3 种昆虫中 AFPs 的存在。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

黄粉虫幼虫为实验室饲养,饲养温度为 25℃,湿度为 60%~80%,光周期为 16L∶8D。2012 年 9 月下旬,在内蒙古大兴安岭林区采集到 3 种越冬态昆虫——稠李巢蛾 *Yponomeuta evonymallus* 幼虫、舞毒蛾 *Lymantria dispar* 卵和落叶松八齿小蠹 *Ips subelongatus* 成虫,采集回后放入 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2 血淋巴和总蛋白的提取

黄粉虫幼虫血淋巴的收集用双管离心法(Xu *et al*., 2006):在 0.5 mL 的锥形离心管底部用针扎数个小孔,放入被剪断足的幼虫。将 0.5 mL 离心管插入 1.5 mL 离心管中,离心后在 1.5 mL 离心管底部收集血淋巴。

黄粉虫幼虫总蛋白的提取参照 Graham 和 Davies(2005)以及 Wharton 等(2009)法:虫体称重后,按照 10∶1 (v/w)的比例加入匀浆缓冲液(25 mmol/L Tris, 0.2% Tween-20, 1% PMSF, pH 8.0),在冰上匀浆 20 min 后,离心取上清,即为总蛋白提取液。采用 BCA 法测定蛋白浓度,最后稀释到 2 mg/mL 待用。

稠李巢蛾 *Y. evonymallus* 幼虫、舞毒蛾 *L. dispar* 卵和落叶松八齿小蠹 *I. subelongatus* 成虫 3 种昆虫由于个体较小(比如稠李巢蛾的幼虫体长不到 1 mm),难以获取血淋巴。因此,实验中提取了总蛋白(提取方法同黄粉虫幼虫)作为 THA 的检测材料。

以 2 mg/mL 的牛血清蛋白(BSA)进行对照实验。

1.3 试验仪器

Perkin-Elmer DSC-8000 系统用于测量热滞活性。该仪器是美国 Perkin-Elmer 公司生产的最新一

代功率补偿型差示扫描量热仪，低温时用内制冷机冷却，以高纯氮气作试样气氛控制，使用温度范围为 -180 ~750℃。仪器采用两点温度校正法，标样为十八烷和超纯水。在实验温度范围,能保持良好的线性升降温速率。

1.4　差示扫描量热法

1.4.1　具体步骤：取 5 μL 的样品注射于样品池底部中央，密封，分析天平称重，以空铝皿为参比。设备稳定后，先从室温降到 -30℃，然后升温至 15℃，再降温至 -30℃，记录体系熔融焓(ΔH_m)和样品熔点(T_m)。接着，缓慢升温至样品体系为固液混合物的状态，称为保留温度(T_h)，在该温度下停留一段时间，再将温度从 T_h 降低至 -30℃，重复上述过程，在不同的 T_h 下停留，分别记录不同 T_h 下样品体系开始结晶的温度(T_f)，以及结晶焓(ΔH_f)。每个生物样品重复 3 次。

1.4.2　参数设置：低温终点为 -30℃(使样品完全结冰)，低温终点停留时间为 3 min(使系统稳定)；在 T_h 停留时间为 5 min(使 AFPs 充分作用和系统稳定)；升降温速率为 1℃/min。

1.4.3　计算：冰晶含量 $\Phi = (1 - \Delta H_f/\Delta H_m) \times 100\%$ ，其中,Φ 为样品中的冰晶含量，ΔH_f 为保留温度停留后继续降温过程中体系的放热焓，ΔH_m 为样品熔融焓。热滞活性 THA = $T_h - T_f$，其中,THA 为热滞活性，T_h 为保留温度，T_f 为保留温度停留后融化部分再次结晶的温度。

2　结果与分析

2.1　牛血清蛋白的热滞活性

用差示扫描量热法检测牛血清蛋白(BSA)的热滞活性，得到了其热流曲线图(图 1)。从图中可以看出，完全结冰的牛血清蛋白溶液被加热到不同的停留温度，使之处于冰水混合物状态。停留一段时间后，再次降温，已融化的部分立即结冰，没有出现结冰点的滞后。这说明牛血清蛋白没有热滞活性。后续的实验都以 BSA 作为对照。

2.2　黄粉虫幼虫总蛋白的热滞活性

用 DSC 法分别对黄粉虫幼虫总蛋白和血淋巴进行了 THA 检测，得到了两者的热流曲线图(图 2：A，B)。在对总蛋白的检测中发现，完全结冰的总蛋白溶液被加热到不同的停留温度，停留一段时间后，再次降温时，已融化的部分没有立即结冰，而是出现了结冰点不同程度的滞后。这表明黄粉虫总蛋白具有热滞活性(0.49 ~0.98℃)(图 2：A)。但是，与图 2(B)中血淋巴的热滞活性(2.54 ~4.34℃)相比，总蛋白中检测到的 THA 比较低，而且热流曲线不太平滑。尽管如此，也足以判断黄粉虫幼虫能够产生抗冻蛋白。因此，通过 DSC 法检测昆虫总蛋白是否存在热滞活性来判断 AFPs 的存在这种方法是可行的。

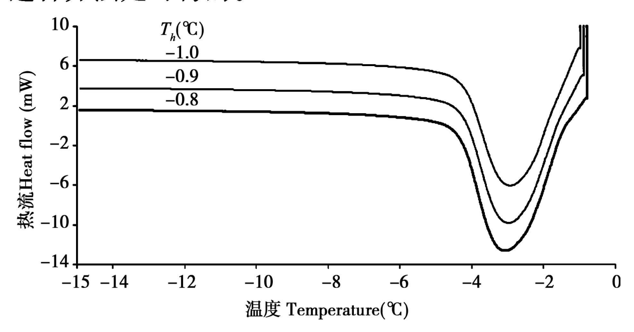
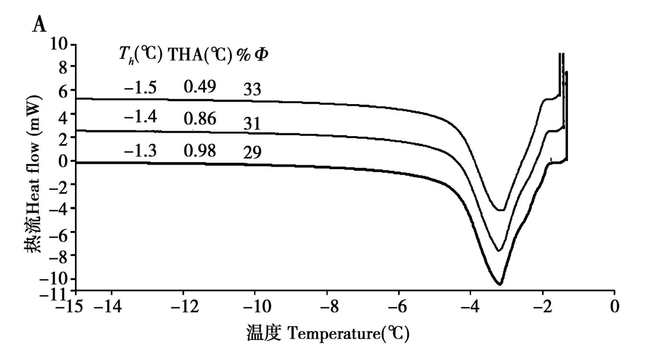


图 1　牛血清蛋白的热流曲线

Fig. 1　DSC curves of BSA

T_h：保留温度 Hold temperature.



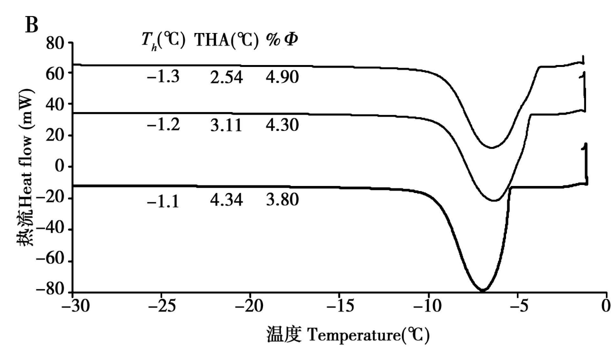


图 2　黄粉虫幼虫总蛋白(A)和血淋巴(B)的热流曲线

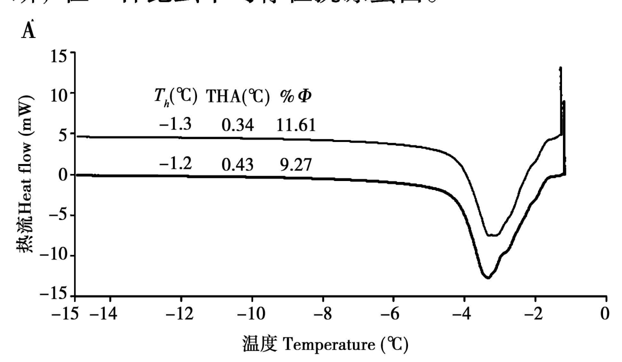
Fig. 2　DSC curves of the total protein (A) and hemolymph (B) in *Tenebrio molitor*

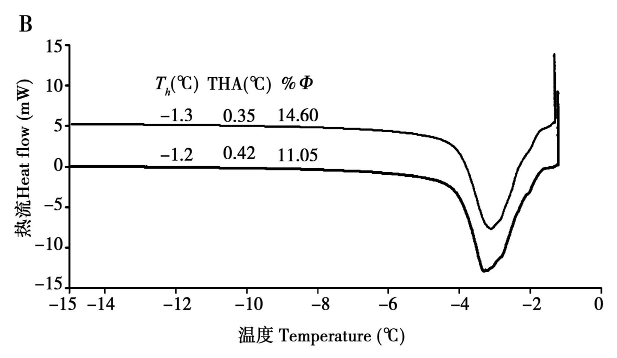
T_h：保留温度 Hold temperature；THA：热滞活性 Thermal hysteresis activity；Φ：冰晶含量 Ice crystal content. 下图同 The same for the following figures.

2.3　3 种昆虫总蛋白的热滞活性

在确定了 DSC 法检测总蛋白热滞活性的可行

性后，用 DSC 法分别对稠李巢蛾幼虫、舞毒蛾卵和落叶松八齿小蠹成虫的总蛋白进行了 THA 检测，并且得到了三者的热流曲线图(图 3:A，B，C)。在三者的图中都可以看出，完全结冰的总蛋白溶液被加热到不同的停留温度，停留一段时间后，再次降温时，已融化的部分没有立即结冰，而是出现了冻结的滞后。这说明 3 种昆虫的总蛋白具有热滞活性(稠李巢蛾的热滞活性为 0.34 ~ 0.43℃，舞毒蛾的热滞活性为 0.35 ~ 0.42℃，落叶松八齿小蠹的热滞活性为 0.37 ~ 0.40℃)，只是 THA 都比较低，不足 0.50℃。同时，还发现三者的热流曲线同黄粉虫总蛋白的热流曲线一样，都不太平滑。但是，足以判断，在 3 种昆虫中均存在抗冻蛋白。





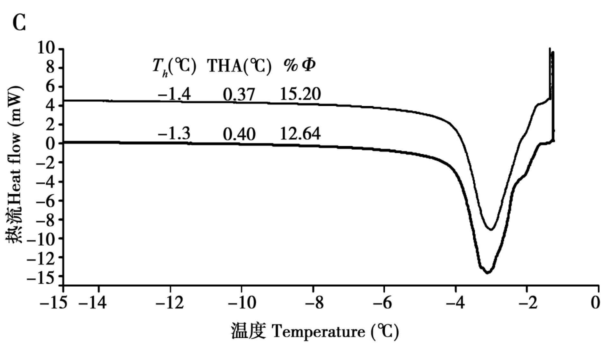


图 3 稠李巢蛾幼虫(A)、舞毒蛾卵(B)和落叶松八齿小蠹成虫(C)总蛋白的热流曲线

Fig. 3 DSC curves of the total protein in *Yponomeuta evonymallus* larvae (A), *Lymantria dispar* eggs (B) and *Ips subelongatus* adults (C)

3 讨论

目前，大都是通过检测血淋巴是否存在热滞活性来判断昆虫抗冻蛋白的存在(Duman, 1976)。但对于难以采集血淋巴的昆虫，则需要提取总蛋白进行 THA 的检测。而对昆虫总蛋白的 THA 检测，使用较多的是纳升渗透压仪法(Graham and Davies, 2005; Wharton, 2011)，但此方法缺点在于无法精确控制和测定体系的冰晶含量，不利于进一步揭示结晶过程中体系发生的变化(邵强等, 2005)。本研究用 DSC 法在黄粉虫幼虫总蛋白中检测到了 THA，由此可以判断黄粉虫总蛋白中存在 AFPs。因此，通过 DSC 法检测昆虫总蛋白是否存在 THA 来判断 AFPs 的存在是可行的。对差示扫描量热法在昆虫总蛋白热滞活性检测中的探究，不仅证明了这种方法的可行性，更为抗冻蛋白的发现和研究提供了一个好的方法和思路。

多数能产生抗冻蛋白的昆虫的血淋巴热滞活性大约在 2 ~ 5℃ 范围内，少数能达 8 ~ 9℃ (Duman, 2001)。而本研究从总蛋白中检测到的 THA 都比较低，最高也不到 1℃。可能因为总蛋白中杂蛋白比较多，AFPs 含量非常低。而大多数昆虫都是用血淋巴进行检测，血淋巴中含有相对丰富的抗冻蛋白。据报道，抗冻蛋白的热滞活性与浓度呈双曲线关系(Duman *et al*., 1998)。另外，还发现总蛋白的热流曲线不太平滑，可能因为降温过程中有杂蛋白析出。如果进一步将抗冻蛋白分离纯化出来，也许会检测到更高的热滞活性，热流曲线可能会变得平滑。

研究中还发现，热滞活性大小与初始冰晶量有关：随着初始冰晶含量的降低，热滞活性从无到有，然后升高，最后再无。这表明当体系内有大量冰晶存在时，冰晶表面 AFPs 的吸附程度比较低，AFPs 不足以抑制降温时冰晶的生长趋势，因此检测不到 THA。当初始冰晶量降到一定程度并且继续降低时，冰晶表面 AFPs 的吸附覆盖程度就越高，对冰晶继续生长的抑制作用越强，检测到的热滞活性也就越高。当初始冰晶量降到很低的程度以至接近于零时，体系中不存在冰晶核，AFPs 不足以发挥作用。由此可见，AFPs 的热滞活性并不是个恒定值，而是在一定范围内与初始冰晶量成正相关。

内蒙古大兴安岭林区位于内蒙古自治区东北部，地处欧亚大陆中高纬度地带，属寒温带大陆性

季风气候区。春季多风而干旱，夏季短暂而温热，秋季降温急剧，常有霜冻，冬季漫长寒冷。年平均气温 -5 ~ 0℃，最冷月（1月）平均气温为 -24 ~ -31℃，极端最低气温 -52℃。9月下旬最低温可达到0℃，许多昆虫开始越冬。内蒙古大兴安岭林区的昆虫区系属古北区，东北亚区。林区约有1 000多种昆虫，其中鞘翅目和鳞翅目数量最多。本研究采集了3种越冬态昆虫（舞毒蛾、稠李巢蛾和落叶松八齿小蠹），都属于林区主要害虫，对它们的越冬机制还不是很清楚。提取了这3种昆虫的总蛋白之后，用DSC法分别进行了THA检测，都检测到了热滞活性。这就证明了这3种昆虫能以产生AFPs的方式作为其适应低温的策略之一。世界范围内，科学家在50多种昆虫中发现了抗冻蛋白，大多数属于鞘翅目和鳞翅目（Duman *et al.*, 2004）。我国昆虫资源丰富，但是关于发现抗冻蛋白的报道很少。这3种昆虫抗冻蛋白的发现不仅增加了产生抗冻蛋白昆虫的数目，还是首次在内蒙古大兴安岭林区发现具有抗冻蛋白的昆虫，并且丰富了我国的昆虫抗冻蛋白资源。

综上所述，通过探究发现通过差示扫描量热法检测昆虫总蛋白的热滞活性来判断抗冻蛋白的存在是可行的，并且运用此法在3种内蒙古大兴安岭林区越冬态昆虫中发现了抗冻蛋白，为进一步研究这些昆虫的抗寒性奠定了基础。

参考文献（References）

Celik Y, Graham LA, Mok YF, Bar M, Davies PL, Braslavsky I, 2010. Superheating of ice crystals in antifreeze protein solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(12): 5423 - 5428.

Duman JG, 1976. The role of macromolecular antifreeze in the darkling beetle, *Meracantha contracta*. *Journal of Comparative Physiology B*, 115: 279 - 286.

Duman JG, 1980. Factors involved in the overwintering survival of the freeze tolerant beetle, *Dendroides canadensis*. *Journal of Comparative Physiology B*, 136: 53 - 59.

Duman JG, 2001. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. *Annu. Rev. Physiol.*, 63: 327 - 357.

Duman JG, Bennett V, Sformo T, Hochstrasser R, Barnes BM, 2004. Antifreeze proteins in Alaskan insects and spiders. *J. Insect Physiol.*, 50(4): 259 - 266.

Duman JG, Li N, Verleye D, Goetz FW, Wu DW, Andorfer CA, Benjamin T, Parmelee DC, 1998. Molecular characterization and sequencing of antifreeze proteins from larvae of the beetle *Dendroides canadensis*. *Journal of Comparative Physiology B*, 168(3): 225 - 232.

Graham LA, Davies PL, 2005. Glycine-rich antifreeze proteins from snow fleas. *Science*, 310: 461.

Graham LA, Liou YC, Walker VK, Davies PL, 1997. Hyperactive antifreeze protein from beetles. *Nature*, 388: 727 - 728.

Grimstone AV, Mullinger AM, Ramsay JA, 1968. Further studies on the rectal complex of the mealworm *Tenebrio molitor* L. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 253(788): 343 - 382.

Hansen TN, Baust JG, 1989. Differential scanning calorimetric analysis of *Tenebrio molitor*. Antifreeze protein activity. *Cryobiology*, 26: 383 - 388.

Knight CA, Duman JG, 1986. Inhibition of recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins - a possible cryoprotective role. *Cryobiology*, 23(3): 256 - 262.

Kristiansen E, Pedersen S, Ramløv H, Zachariassen K, 1999. Antifreeze activity in the cerambycid beetle *Rhagium inquisitor*. *Journal of Comparative Physiology B*, 169(1): 55 - 60.

Kukal O, Duman JG, 1989. Switch in the overwintering strategy of two insect species and latitudinal differences in cold hardiness. *Canadian Journal of Zoology*, 67(4): 825 - 827.

Shao Q, Li HF, Liu GS, Yan QH, 2005. Antifreeze activity of antifreeze protein and its quantitative analysis. *Journal of Pingyuan University*, 22(4): 111 - 113. [邵强，李海峰，刘国生，闫清华，2005. 抗冻蛋白的抗冻活性及其测定方法. 平原大学学报，22(4): 111 - 113]

Wharton DA, 2011. Cold tolerance of New Zealand alpine insects. *J. Insect Physiol.*, 57(8): 1090 - 1095.

Wharton DA, Pow B, Kristensen M, Ramlov H, Marshall CJ, 2009. Ice-active proteins and cryoprotectants from the New Zealand alpine cockroach, *Celatoblatta quinquemaculata*. *J. Insect Physiol.*, 55(1): 27 - 31.

Xu WY, Huang FS, Hao HX, Duan JH, Qiu ZW, 2006. Two serine proteases from *Anopheles dirus* haemocytes exhibit changes in transcript abundance after infection of an incompatible rodent malaria parasite, *Plasmodium yoelii*. *Veterinary Parasitology*, 139(1 - 3): 93 - 101.

Zhang C, Zhao XY, Ma Y, Zhang H, Yao HY, 2008. Determination of thermal hysteresis activity of antifreeze protein by differential scanning calorimetry. *Acta Biophysica Sinica*, 24(6): 465 - 473. [张超，赵晓燕，马越，张晖，姚惠源，2008. 使用差示扫描量热仪测定抗冻蛋白热滞活性方法的研究. 生物物理学报，24(6): 465 - 473]

Zhao Y, Kang L, 2000. Cold tolerance of the leafminer *Liriomyza sativae* (Dipt., Agromyzidae). *Journal of Applied Entomology*, 124(3(4): 185 - 189.

（责任编辑：武晓颖）